

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-510783

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)12月1日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 47/48	Z	7433-4C	
C 0 8 B 37/08	A	7433-4C	
A 6 1 K 31/725		9454-4C	
31/73		9454-4C	
31/785		9454-4C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-505995
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)9月25日
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)3月25日
(86) 国際出願番号	PCT/SE92/00672
(87) 国際公開番号	WO93/05793
(87) 国際公開日	平成5年(1993)4月1日
(31) 優先権主張番号	9102798-7
(32) 優先日	1991年9月26日
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人	コルリーネ・システムズ・アクチエボラ グ スウェーデン国エス-750 08 ウプサラ、 ボツクス8037
(72) 発明者	ラーソン、 ロルフ スウェーデン国エス-756 52 ウプサラ、 ブルームステル ヴエイエン19
(72) 発明者	ヴェストベルイ、 ダーヴィッド スウェーデン国エス-752 21 ウプサラ、 セントヨーハン ネスガタン12
(74) 代理人	弁理士 高木 千嘉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規接合体、その調製および使用ならびにその接合体を用いて調製された基体

(57) 【要約】

本発明は、多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた実質的に鎖状の有機ポリマーであって、それら官能基を介してその非活性部分中の硫酸化グリコサミノグリカン類群からの多数の分子が共有結合を通して結合されているものより成る実質的に水溶性の生物学的に活性な結合体に関する。また本発明は接合体の製造、接合体を用いた基体表面の調製、このようにして調製された基体表面および治療剤として用いるための接合体にも関する。

請求の範囲

1. 多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた実質的に線状の有機ポリマーであって、それら官能基を介してその非活性部分の硫酸化グリコサミノグリカン類群からの少なくとも約20分子が共有結合を通して結合されているものより成る実質的に水溶性の生物学的に活性な複合体。
2. 前記ポリマーが天然または合成のポリペプチド、多糖体または脂肪族ポリマーに由来する請求項1記載の複合体。
3. 前記ポリマー鎖がポリリジン、ポリオルニチン、キトサン、ポリイミンまたはポリアリアルアミンに由来する請求項2記載の複合体。
4. グリコサミノグリカン類が実質的に単結合を介して、好ましくは末端でポリマー主鎖に結合されている請求項1、2または3記載の複合体。
5. グリコサミノグリカン類が硫酸グリコサミノグリカン類に結合したアミノ基を介したポリマー主鎖に結合されている請求項1〜4のいずれかに記載の複合体。
6. 複合体がそのグリコサミノグリカン類の故に、水に溶解された場合に実質的にその全長に亘って正荷電基体表面に静電的相互作用により実質的に不可逆的に結合され得るのに十分なポリ陽イオン特性を有することを特徴とする請求項1〜5のいずれかに記載の複合体。
7. 少なくとも30グリコサミノグリカン残基を有する請求項1〜6のいずれかに記載の複合体。
8. 少なくとも100グリコサミノグリカン残基を有する請求項7記載の複合体。

に活性な複合体の調製方法。

16. 多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた実質的に線状の有機ポリマーであって、それら官能基を介して硫酸化グリコサミノグリカン類群からの多数の分子が共有結合を通して結合されているものより成る複合体を該複合体に対するアフィニティーを有する基体表面と、複合体がそこに実質的に不可逆的に結合されるように接触させることを特徴とする、硫酸化グリコサミノグリカン類による表面の調製方法。
17. 複合体がポリ陽イオン特性を有し、基体表面が陽イオン性である請求項16記載の方法。
18. 溶媒剤として用いるための請求項1〜12のいずれかに記載の生物学的に活性な複合体。

載の複合体。

9. 前記グリコサミノグリカンがヘパリンまたはその断片または誘導体である請求項1〜8のいずれかに記載の複合体。
10. グリコサミノグリカン残基が結合配列を介してポリマー主鎖に結合される請求項1〜9のいずれかに記載の複合体。
11. 前記結合配列がヘテロ一二官能性結合試薬に由来する請求項10記載の複合体。
12. ポリマー主鎖がグリコサミノグリカン類のほかにも一つ以上の付加的な生物学的に活性な物質の残基を担持する請求項1〜11のいずれかに記載の複合体。
13. 複合体が多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた実質的に直鎖状の有機ポリマーであって、それら官能基を介して硫酸化グリコサミノグリカン類群からの多数の分子が共有結合を通して結合されているものより成り、該複合体は好ましくは該複合体と基体表面との間の静電的相互作用により表面に結合されていることを特徴とする、表面にアフィニティー結合された生物学的に活性な複合体より成る調製された基体表面。
14. 生物学的に活性な複合体が請求項1〜11のいずれかに記載の複合体である請求項13記載の調製された基体表面。
15. 多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた実質的に直鎖状の有機ポリマーを準備し、そしてこれら官能基に、所望により結合剤を介して、その非活性部分の硫酸化グリコサミノグリカン類群からの多数の分子を共有結合的に結合させることより成ることを特徴とする、硫酸化グリコサミノグリカン類群からの多数の分子を担持する実質的に直鎖状の有機ポリマーより成る生物学的

明 細 書

新規複合体、その調製および使用ならびに
その複合体を用いて調製された基体

本発明は、硫酸化グリコサミノグリカンに基づく新規な生物学的に活性な複合体、その複合体の調製方法、その表面がかかる複合体を用いて調製されている基体、およびその複合体を用いた表面調製方法に関する。

硫酸化グリコサミノグリカン類は、多くの内生硫酸化ムコ多糖類、例えばヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン硫酸など多くの様々な生物学的性質を示すものの普通名称である。本発明は硫酸化グリコサミノグリカン類一般に関するものであるが、以下においては、これまで医学的に最も用いられているグリコサミノグリカン、すなわちヘパリンに関する記載が大部分である。

ヘパリンは様々な哺乳動物組織、例えば腸、肝臓および肺臓のほかマスト細胞中で、タンパク質に複合した形で天然に存在しそのうえ100,000までに及ぶ分子量を有しているが、市販の調製物は、給餌および測定方法に応じて約6,000〜20,000の範囲で変動する分子量を有している。それは交互に存在するグルクロン酸およびグルコサミン単位より成り、またその抗凝固作用は抗トロンビン結合特性を有する分子の特定の五糖単位に結合していることが示されている。

ヘパリンは通常ブタ腸粘膜から調製されるが、その抗凝固作用の故に、血漿を溶解するための多分就中血栓形成を防止するための、剤として用いられている。後者は、とりわけ例えば血液が生体によって異物である各種物質と接触することになる体の外の循環系、い

いわゆる体外循環(例えば人工腎臓、人工心肺装置、酸素供給器)における患者血液の処理を伴うような手順、例えば腎疾患治療、開心術および集中治療などにおける手順の場合に用いられる。

このような系における血液の凝固性を除去し、またそれによって血栓による凝固を避けるためには高用量のヘパリンを血液に添加する必要がある。それに伴って出血の危険が実質的に高まり、またそれは最悪の場合には生命を脅かす状態を招きかねないことから過去長い間、そのかわりにヘパリンを表面結合することにより血液が接触する生体にとって異物である物質を反応させて所望の凝固防止作用を達成させようとする努力が払われてきている。この開発を刺激した決定的要因は、ヘパリンの構造-活性相関が解明されたこと、および、ヘパリン排活性が天然の血管壁上に使用されたことである。すなわち、この数年の間に、表面結合ヘパリンを備えた系による体外治療の成功に関する報告がいくつか発表されている。

しかしながら、ヘパリンによる表面反応性は前述の体外血液循環に関する文献に限定されるものではなく、血液および他の生体組織と接触する医療における様々なデバイスのバイオコンパチビリティを達成するという課題に対するより一般的な解決策として考えられるようになってきている。例えば、表面ヘパリン化は眼内レンズのバイオコンパチビリティを向上させるためにも用いられている。

ヘパリンの固定という課題に対して従来から用いられている解決策は二つの主な原理、イオン的に結合したヘパリンと共有結合的に結合したヘパリンに分けることができる。これを以下詳述する。固定化ヘパリンに基づく所望のバイオコンパチビリティを示す表面を得るにはヘパリンがその生物学的活性が保たれるように固

定されることが重要である。導入部に記したとおり、ヘパリンの生物学的活性は特定の抗トロンビン-結合性五糖構造にあり、血液の凝固成分との相互作用が可能となるにはその構造が表面に固定された後も完全な形で残っていなければならない。ヘパリンの固定化に関する大部分の学術論文および特許、特に1980より前に発表されたものでは、この点で満足のものはなく、また、その調製方法が完全なバイオコンパチブル表面を与えるかどうかの判断を可能にする結果となるとはるかに少ない。以下に、既知のヘパリン固定化方法を総括する。

1. イオン的に結合したヘパリン

ヘパリンは極めて多数の負電荷基を含んでいるので、ヘパリン分子は静電相互作用だけを通して陽イオン性表面に比較的強く結合することができる。慣用される手順の一つは、ヘパリンをその水性溶液から陽イオン界面活性剤で沈殿された後、乾燥沈殿を有機溶媒で溶解することより成る。後者の溶媒は、次いでいわゆる浸漬-乾燥(dip-dry)法に用いられる。乾燥速度を減じるために様々な分枝界面活性剤が試験されている。その他の方法は第四級アンモニウム基へのヘパリンの吸着に基づいている。イオン的に結合したヘパリン表面が共通して持つ大きな短所の一つは、血液と接触しているヘパリンの遊離に関する安定性が不十分な点である。

O. Laroche, Bioact., Med. Dev., Art. Org., 11(1982)161-173で特に、安定なイオン的に結合した表面の調製方法を記載している。しかしながら結合型ヘパリンはその生物学的活性を失うと報告されているが、このことは、各個ヘパリン分子があまりに強固に結合されているために抗トロンビン結合配列が血中凝固成分と緊密に結合

固ないということと関係しているかもしれない。

イオン的に結合したヘパリン複合体のグルタルアルデヒドによる安定化処理がUS-A-3,810,781およびUS-A-4,118,485に記載されている。学術報告にあるように、これらの調製選択性によっては完全に安定な表面は得られない。従って、ヘパリンそして多分グルタルアルデヒドとの様々な反応生成物も初期の接触中に血液経路に遊離してしまう。

2. 共有結合的に結合したヘパリン

純化学的見地からは共有結合によるヘパリン固定化方法には多くの様々なものがある。しかしながら、具化シアン、カルボジイミドおよび同様の一般的に用いられる結合試薬を用いる場合には、各ヘパリン分子が活性配列中の結合を含むいくつかの結合により結合される。またそのためにヘパリンがその生物学的活性を失うという明らかな危険が存在する。共有結合結合試薬はそれ以外に、常にそれ自体有毒であり、従って最終生成物と接触させるべきでない。

しかしながら、US-A-4,613,665は、ヘパリンおよび他の多糖体をヘパリン分子中末端に局在する単一の反応性アルデヒド基を介して結合する方法を記載している。この場合、ヘパリンは抗トロンビン結合性配列を結合に関与させることなく共有結合的に結合させることは可能である。しかしながら、この方法では、ヘパリンを部分的に分解すること、そして強毒性物質であるシアノボロヒドリドを最終調製工程に存在させることが必要となる。

EP-A-351,314は、N-アセチル化に付されたヘパリンの遊離アミノ基を利用することによりヘパリンを遊離アミノ基含有基体表面に(例えばポリエチレンイミンまたはキトサンによる表面処理を通じ

て)結合する方法を記載している。次に多官能性アルデヒド、例えばグルタルアルデヒドを用いて破傷が行われる。しかしながら、グルタルアルデヒドとの反応工程は、活性配列が関与しないように確実にコントロールすることができず、また方法自体が、技術的観点からして、実施上相当複雑である。

US-A-4,239,664は、PVPを鎖ポリマーが次いでヘパリン上の水酸基と反応するイミドイルイオンを含有するように反応することにより調製されたPVP-ヘパリンポリマーを記載している。この方法は、必然的にヘパリンに対し多重の非特異的結合を与え、その生物学的活性に影響を及ぼす。そのPVP-ヘパリンポリマーは持続一貫して低い抗凝固活性を有しているとされている。

EP-A-294,905はヘパリンのような抗凝固剤をポリ酸を介して結合したポリマー基体を開示している。この基体は、ポリ酸をポリマー表面上の少数の反応性基に共有結合的に結合することによって利用可能な表面反応性基の数を増加させることにより調製される。次に抗凝固剤を具体的には既にその欠点について記した前記US-A-4,613,665に記載の方法によって、ポリ酸のカルボキシルまたはアミノ基に共有結合的に結合する。

US-A-4,415,490は、ヘパリンが各結合部位において唯一のアセチルまたはヘミアセチル結合を通して各種ポリマーに結合した非血栓性材料を開示している。一態様においては、アルデヒド基をセルロースなどのポリマーに導入した後、そのアルデヒド基をヘパリン中の水酸基と反応させる。このプロセスには各ヘパリン分子の複数の水酸基が関与し、またヘパリンの生物学的に活性な配列(この配列は当該特許の出願日には客観的文献に知られたり記載された

特表平6-510783(4)

りしていなかった)において水酸基が利用できることから、その活性配列中の水酸基も関与し、その結果最終生成物が不活性になるという明らかな危険がある。もう一つの選択法としての懸念においては、代りにアルデヒド基を適当な実験処理によりヘパリンを導入する。この懸念も特異性を欠き、従って結合は活性配列を含むヘパリン鎖においてランダムに生じる

このように、以上から明かなように表面-ヘパリン化についてこれまで知られた方法は、多かれ少かれ重大な欠点を伴っている。従って簡単に実施でき、また有毒物質を含まずかつヘパリンの生物学的活性が保持された安定なヘパリン化表面を与える表面-ヘパリン化方法が必要とされている。

ヘパリンの治療剤としての用途にもヘパリンの過半減額および/またはアフィニティーの故に制約がある。ヘパリンを抗凝固剤として用いる場合だけでなく、例えば血管閉塞(過形成)の場合の平滑筋細胞の増殖阻害剤として、例えば慢性関節リウマチなどのための炎症剤として、および血管形成(脈管形成)阻害剤としての研究された用途に用いる場合に、特にそうである。ヘパリンの様々な性質の総括は"Heparin: Clinical and biological properties. Clinical applications." LaneおよびLindahl編、Edward Arnold, ロンドン、1989年にみることが出来る。従って長い半減期と増大したアフィニティーを有するヘパリン置換物が必要とされている。

本発明によれば硫酸化グリコサミノグリカン類に基づく生物学的に活性な複合体が提供され、その複合体によって硫酸化グリコサミノグリカン類の性質を個々の物質よりもはるかに効率的に利用することができる。かかる複合体はとりわけ、複合体にアフィニティー

を有する基体表面に安定的に結合させることができ、そしてそれによって例えばヘパリンの場合には、従来方法によるより簡単かつ効率的に表面-ヘパリン化を行うのに用いることができる。さらに、かかる複合体は結合物質に基づく置換物よりも長い半減期および向上したアフィニティーを有するグリコサミノグリカン置換物を与えることができる。

ヘパリンについて記述したように、硫酸化グリコサミノグリカン類は天然にはタンパク質に結合した形で存在する。すなわち、例えばヘパリンの場合には、約15ヘパリン鎖が約25アミノ酸残基のタンパク質に結合し、一方、ヘパリン硫酸を含むプロテオグリカンに配属されたヘパリン硫酸鎖の方はほとんどなくはるかにまばらである。天然複合体は純粋な形で置換することが極めて困難であり、また我々の知る限り治療または同様の用途には提案されていない。本発明は、硫酸化グリコサミノグリカンとポリマー担体との間で半または全合成複合体を作るという思想に基づいている。この複合体は、とりわけより多くの分子の当該グリコサミノグリカンを含むことにより、個々のグリコサミノグリカン類および天然複合体よりも改善された性質を有し、またさらに相対的組成を様々な用途に適するよう調整可能に定めることができるという重要な長所を有する。

すなわち本発明はその最も広い範囲において、多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた実質的に直鎖状の有機ホモまたはヘテロポリマーであって、それら官能基を介してその非活性部分中の硫酸化グリコサミノグリカン類(GAG)類からの少なくとも約20分子が共有結合を通して結合されているものより成る、好ましくは、実質的に純粋な形の、少なくとも実質的に水溶性の生物学的に活性

な複合体(巨大分子)を与える。

かかる複合体は概念的に合成プロテオグリカンと表わすことができ、その相対的組成は、調整可能に定めることができまた意図する用途に適合させることができる。

本明細書における「硫酸化グリコサミノグリカン類」という表現は、その用語に通常含まれる物質、例えばヘパリン、ヘパリン硫酸、デルマタン硫酸およびコンドロイチン硫酸などのみならず、目的にかなった機能を果たすこれらの物質の断片および誘導体をも包含することを意味する。

グリコサミノグリカン残基の担体として機能する実質的に鎖状のポリマー鎖は当然のことながら、当該一個または二個以上のグリコサミノグリカンの結合後は、少なくとも干渉性の生物活性を欠くべきであるという意味において、実質的に生物学的に不活性であるべきである。容易に理解されるように、複数のグリコサミノグリカン残基の結合を可能とするために、そのポリマー鎖は該鎖に沿って分布され、そして任意に行われる変性後は直接または結合配列を介してグリコサミノグリカンに結合され得る多くの官能基例えばアミノ、ヒドロキシルまたはカルボキシル基などを有すべきである。ここで注意すべきは、当該グリコサミノグリカンがその置換方法によっては、依然として、その天然複合体タンパク質のそれに結合した末端残基を有している可能性があり、その場合結合は当然のことながら有利なことにかかる残基中の例えばアミノ酸を介して行われる点である。

さらに、担体ポリマーは好ましくは良好な水溶性を有するべきである。少なくともそれは、複合体について取述されたところに従

て、グリコサミノグリカン基の結合後、少なくとも実質的に水溶性であるべきである。本発明の目的に適する特定のポリマー鎖は一般的発明概念により当業者には容易に明らかとなろう。もちろんのことながら、「実質的に鎖状の」という表現の範囲内で許容されるポリマー鎖上の分枝についてもこのことがいえる。

しかしながら、好ましくは、ポリマー鎖は天然または合成のポリペプチド、多環体または脂肪族ポリマーである。特定の例としてはポリリジン、ポリオルニチン、キトサン、ポリイミンおよびポリアミンが挙げられる。

グリコサミノグリカンがポリマー担体に結合した後もその生物学的活性を維持することが通常望ましいという点については、各グリコサミノグリカン分子を末端で、そして単結合のみにより担体ポリマーに結合することが望ましい。適切には、グリコサミノグリカンはアミノ酸、好ましくは末端アミノ酸を介して結合されるが、グリコサミン単位の前アミノ基を用いてもよい。後者は、それ自体遊離状態で存在していてもよく、あるいは脱硫酸または脱アセチル化を遊離させてもよい。

ポリマー主鎖1個あたりのグリコサミノグリカン残基数は、前述のとおり少なくとも20であるが、好ましくはそれより多く、通常は少なくとも30である。以後に示す実施例から明かなように、使用ポリマー主鎖によっては、ポリマー主鎖1個あたりのグリコサミノグリカン残基数は少なくとも60および100以上であってさえも好ましい場合がある。上限は状況に依存し、そして、特に、選定された担体ポリマーの溶解特性、許容される粘度の高さなどによって設定される。グリコサミノグリカン単位の置換数は、一定の複合体の

意図される用途に加え、担体ポリマーは、特にそのサイズにも依存する。後で詳述される、接合体の基体表面への静電結合の場合には、もちろん、基体表面の電荷密度も考慮しなければならない。従って、それらグリコサミノグリカン残基は、相互に干渉しあうほどに接近した位置にあるべきではなく、さりとて、それらの間のギャップを占めないようにすべきである。一例として、例えば担体ポリマーとしてのポリリジンが約50,000より高い分子量を有する例が挙げられる。しかしながら、各々の特定の担体ポリマーおよび用途それぞれに適したグリコサミノグリカン残基数は当業者により容易に決定されよう。

特にアミノ官能性ポリマーを担体として用いる場合、場合によっては特にポリマー主鎖がグリコサミノグリカン類によってまばらにしか置換されない場合には、残った遊離アミノ基をブロックすることが好ましいことがあり、そしてこれは例えばアセチル化によって行われ得る。別の選択法としてのアプローチとして、所望数のアミノ基を例えばメチル基で置換してからグリコサミノグリカン類を結合させることも可能である。

既に示したとおり、本発明による新規接合体は、接合体に対する（通常はそうであるが、必ずしもグリコサミノグリカン残基に対してではない）アフィニティを有する表面に結合してよく、それによって表面に所望の生物学的活性を付与することができる。本発明の更なる観点によれば、このような調製表面は、多数の官能基をポリマー主鎖において分布させた實質的に鎖状の有機ポリマーであって、それら官能基を介して硫酸化グリコサミノグリカン類群からの多数の分子が共有結合により結合されているものより成る生物学的

に活性な接合体を適当な条件下に、接合体に対するアフィニティを有する表面と単に接触させることによって完成される。

本発明のもう一つの観点は、多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた實質的に鎖状の有機ポリマーであって、それら官能基を介して硫酸化グリコサミノグリカン類群からの多数の分子が共有結合により結合されているものより成る生物学的に活性な接合体を提供する。

接合体と基体表面の間の好ましい形のアフィニティは静電的性質を有するものであり、そしてより詳細にはその結合は狭くより詳しく例示されるように、グリコサミノグリカン残基と基体表面の間の静電的相互作用によって生起する。

本発明による接合体のグリコサミノグリカン分子は担体ポリマーに対し大過剰なので、この接合体は「巨大分子グリコサミノグリカン」と考えてよい。そのため、接合体1個あたりの陰イオン基数は、グリコサミノグリカン1分子あたり存在する数をはるかに上回り、その結果、接合体はそのサイズの故に、イオン性相互作用を通して陰イオン性表面に不可逆的に結合することができる。接合体を表面から遊離させるには、もちろんすべてのグリコサミノグリカン残基を同時に表面から遊離させる必要があるが、それには、「遊離」グリコサミノグリカン分子の遊離に比べて相当なエネルギー供給が必要となる。

後述するある種の状況を除けば、接合体の生物学的活性はグリコサミノグリカン残基によるものと、一般的に考えられる。このような場合には、グリコサミノグリカンの数は、1個体ポリマー鎖あたりのこれらの残基の一般が協働的に陰イオン基が付与されている表

面に対する強固で不可逆的な結合を仲介する一方、残りのグリコサミノグリカン鎖が生物学的組織、例えば血液の成分と相互作用することによりその生物学的活性を自由には発揮できるようにするのに十分なものとすべきである。

前記によるグリコサミノグリカンを用いた表面調製は、従って、共有結合とイオン性相互作用の組合せに基づくもので、このことは接合体が中間生成物として調製される（このことはすべての結合化学操作を最終生成物とは別個に行うことができることを意味している）点で非常に有利である。更に、最終的な表面調製プロセスが極めて簡単となり、また再現性よく行うことができる。従って例えば本発明によるヘパリン接合体を用いた表面ヘパリン化は、前述したとおり、従来の表面ヘパリン化方法に比べ相当に簡易化された効率的ヘパリン化方法を提供する。以上の記載にかかわらず、もちろん、接合体を基体表面にアフィニティで吸着させた後で調製工程を所望により行ってヘパリン化表面の安定性をなお一段と向上させることもできる。

従って本発明のこの特定の観点に従って用いるための接合体は、反対側電基体表面への實質的に不可逆的な結合を可能にするのに十分な静電的効果電荷を有することになる。

前記に従って表面調製、例えば表面ヘパリン化すべき基体材料は、その表面が陰イオン性であるが陰イオン性に行うことができる限り、基本的にバイオコンパチブル化が所望されるいずれの材料であってもよい。前述のとおり、本発明は生体にとって異物である材料、例えば各種ポリマー、金属およびセラミックスなどに適用することができる。しかしながら、本発明は生体材料、すなわち当該

グリコサミノグリカンに対するアフィニティを示す組織表面に適用することもできる。これに関連して、血液に対して体外部構造の異常天然血管壁が抗トロンビン結合性五糖配列を有する硫酸化グリコサミノグリカン類を含んでいる点に注目すると興味深い。

基体表面を陰イオン性にするための各種方法がよく知られている。後述する実施例に記すように、ポリイミンによる処理が適切な方法であることが判明しているが、他のポリアミン、例えばポリリジン、キトサンまたはポリアルアルミンなどを用いてもよい。

新規なグリコサミノグリカン接合体は、本発明の範囲内において、グリコサミノグリカン鎖のほかは一またはそれ以上の他の物質、例えば別の生物学的に活性な物質の鎖を担体ポリマーに結合して含有してもよい。その場合、そのような他の生物学的に活性な物質は、グリコサミノグリカン活性と同時にあるいは別々に作用するようにしてもよい。後者の場合には、相補物質の生物学的活性だけが興味対象となり、グリコサミノグリカン鎖だけが基体表面に対するアフィニティ結合に利用される。従って、本発明による接合体は表面に結合させたい所望の生物学的に活性な物質のための担体としても機能し得る。グリコサミノグリカンに加えてポリマー主鎖に結合し得る物質例は、成長因子、酵素、抗体、マトリックス、タンパク質、ステロイドなどである。この文脈においても、極めて特異的な吸着特性を有する接合体を、例えばグリコサミノグリカン単位に対する補体(complement)としてのモノクローナル抗体を用いて得ることができる点に注目すべきである。

所望により、かかる組合せ接合体の場合には、グリコサミノグリカンそれ自体の生物学的活性を抑制したい場合があるが、これは例

特表平6-510783(6)

例えばヘパリンの凝固阻害活性の場合には脱硫酸化により行うことができる。従って、このような場合、接合体の生物学的活性は、ポリマー主鎖に結合される相補物質の活性に完全に結合することになる。

多くの場合に、必要とはいわないまでも重要なのは接合体の表面-結合作用であるが、この作用は場合によってはそれほど重要でなく、用途によってはそれを多少少なからず完全に抑制したい場合でさえあり得る。同様にして、組合せ接合体について前記したように、純粋なグリコサミノグリカン接合体の場合にもグリコサミノグリカン類の生物学的活性を除去するかまたは少なくとも低下させたい場合があり得る。場合によっては、例えばヘパリンについては、グリコサミノグリカンがいくつかの異なる生物学的作用を有することがあり、そして意図する用途に応じて一方の生物学的活性を他方を優先させるべく抑制することができる。例えばヘパリンの場合に、その抗凝固作用を前述の如く脱硫酸化により阻害する一方、前述の五糖単位に結合されていない他方の生物学的活性は影響されずに保たれるようにすることができる。

従って、以上より明らかなように、新規接合体の組成は、様々な応用分野に適合させるべく広い範囲にわたり変化するものである。

本発明のもう一つの観点点は、多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた実質的に線状の有機ポリマーを供給し、それら官能基に所望により結合剤によりその非活性部分の硫酸化グリコサミノグリカン類からの多数の分子を共有結合的に結合させることによる前記接合体の製造に関する。これは本発明の範囲内においていくつ

かの異なる方法によって行うことができる。

すなわち、グリコサミノグリカンは、例えば、US-A-4,613,665に記載の方法により調製された末端に位置するアルデヒド基を有する亜硝酸分解グリコサミノグリカンを用いてアミノ-官能性ポリマー類に直接結合させることができる。しかしながら、この方法は部分分解グリコサミノグリカンに限定され、また置換度の調節が困難である。さらにまた、ポリマーがグリコサミノグリカンによって沈殿しやすいことから実用上の問題も生じる。

好ましい方法によれば、代わりにグリコサミノグリカン結合剤、好ましくはヘテロ二官能性のものによりポリマー類に結合する。しかしながら、例えばヒドロキシルまたはアミノ基に対する二官能性結合剤は、それぞれ分子内および分子間架橋を招く結果ブロッキングや阻害を伴うので、一般的に使用し得ない点に注意する必要がある。

ここで、本発明による接合体をどのようにして調製できるかについての一例として、ポリリジンへのヘパリンの結合を簡単に説明する。400,000を超える分子量を有するポリリジンを選択することにより1個体分子あたり500個までのヘパリン類を有する合成プロテオグリカンを調製することができる。この目的に適したヘテロ二官能性結合剤であるN-スクシンイミジル-3-(2-ビリジルジチオ)-プロピオネート(SPDP)をポリリジン上のアミノ基に結合し次にそのSPDP-置換ポリリジンをクロマトグラフィーにより精製する。別の結合工程でSPDPは、末端アミノ酸残基中にあるいは遊離グルコサミンとして存在するヘパリン上のアミノ基(後者の含量はN-脱硫酸またはN-脱アセチル化により調節することができる)

実施例1

接合体の調製および表面-結合生物学的活性試験

二つの異なるバッチのヘパリン(ヘパリン、Kabi Pharmacia AB社、スウェーデン、分子量約12,000)を用いた。アミノ酸含量および遊離第一級アミノ基の相対的存在を分析し、次の結果を得た。

	アミノ酸含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	純重量 (mg/mg)	第一級アミン (相対的目盛り)
ヘパリンA	0.36	5.38	5,000
ヘパリンB	0.08	5.37	340

ヘパリンBの示す遊離アミン含量が極めて低いことから、Yuko Inoue et al., Carbohydrate Research, 46(1976)87-95に記載の方法によるN-脱硫酸化を行った。N-脱硫酸化実施後、第一級アミン相対的目盛りで18,000という値が得られた。

ヘパリンAとヘパリンB(脱硫酸化物)をリン酸緩衝液、pH7.5に溶解し(200 $\mu\text{g}/4\text{ml}$)、それに1 ml のSPDP(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NaOH)を攪拌下に添加し、そして反応を20分間進行させた。このようにして得られたSPDP-置換ヘパリンをSephadex® G-25 (Pharmacia LKB Biotechnology AB社、スウェーデン)で精製した。100 μg の得られた試料に900 μg のジチオトレイトール(DTT, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加し、そして得られる吸光度を343nmで分光光度法により測定した。ヘパリンAについての置換度は0.21であり、またヘパリンB(脱硫酸化物)については0.17であった。ヘパリンに結合したSPDPはDTTを添加後クロマトグラフィーにより精製することによりSHまで還元した。

450,000の分子量を有するポリリジンを水に溶解し(20 $\mu\text{g}/3\text{ml}$)、そこに2 ml のSPDP(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NaOH)を添加し、そして反応を攪拌しながら20分間進行させた。精製はSephadex® G-25 (Pharmacia LAB

にも結合される。SPDP-基をチオール官能基に還元後、SH-置換ヘパリンをクロマトグラフィーにより精製する。ポリリジン中のSPDP基およびヘパリン中のSH-基の含量はそれぞれ分光光度法により測定され、そしてヘパリンとポリリジンとをSPDPおよびSHに等モル量を用いて混合し、ヘパリンはジスルフィド交換を介してポリリジンに共有結合的に結合されるが、その反応速度は、分光光度法により追跡することができる。驚くべきことに、ポリリジンにSPDP基が付与されている場合には、ポリリジンのアミノ基のほんの一部しか置換されていなくても、ポリリジンとヘパリンの間の沈殿反応が起こらないということがわかった。にもかかわらず、実際の試験は、ジスルフィド交換が高濃度(適切には3M NaCl)においてのみ、より迅速でありそして完了まで進行することを示している。反応完了後、接合体をクロマトグラフィーにより精製して遊離ヘパリンおよび低分子反応生成物を除去する。

様々な環境でこのように調製されたヘパリン接合体の安定性に関し、驚くべきことに、ヘパリンをポリマー主鎖に結合する得られたジスルフィド橋は、グルタチオンで切断できず、低分子非生理学的チオール試薬、例えばメルカプトエタノールなどでのみ切断し得ることがわかった。

更に、本発明によるヘパリン接合体でヘパリン化することの、実質的長所は従来方法よりも加工度の低いヘパリン原料から出発できることにある点に注目すべきである。

本発明を更に以下の実施例で例説する。

Biotechnology AB社、スウェーデン)で抽出剤として0.15M NaClを用いて行った。空隙(void)部分をDTIで試験し、置換度はポリリジン1分子あたり158 SPDP基を測定された。

以上において調製されたそれぞれヘパリン-SBおよびポリリジン-SDPDPの溶液を3M NaClに調製し、そしてSPDP基に対し50基が10%過剰となるような割合で混合し、そして反応を一夜進行させた。その反応生成物(ヘパリンAおよびヘパリンB(脱炭酸化合物))は完了するまで進行していたが、これはチオビリドンの遊離を343nmで分光光度法により測定された。それら調製物をSepharacyl®S-500(Pharmacia LKB Biotechnology AB社、スウェーデン)で0.5M NaClを抽出液として用いて精製したところ、ヘパリン-ポリリジン複合体は遊離ヘパリンに対するベースライン分離を有する空隙ピークとして現れる。ヘパリン含量はLarsson, R., et al., *Biosaterials* 10 (1989) 511-516に記載のオルミノールアッセイ法により測定した。

次にそれぞれのヘパリン複合体を0.5M NaClを添加したクエン酸緩衝液、pH 3.8中で50mgヘパリン/mlまで希釈した。ポリエチレン(PE)チューブを次のような処理により表面ヘパリン化した:

- 1) 過硫酸アンモニウム (1%, 60℃、120分間)
- 2) ポリエチレンジミン (0.3mg/ml、室温、15分間)
- 3) 前述の如き複合体溶液 (室温、120分間)。

それらチューブを最後に、ホウ酸緩衝液、pH 9で2×10分間および水で洗浄した。

表面ヘパリン化チューブを次の方法に従ってトロンビンの阻害能に関して試験した。それらチューブはまずヒト血漿と共に回転させ

ヘパリン-SBを実施例1と同様にして調製し、そして前記において得られた高置換度のポリリジンと反応させた。反応は77%転化まで進行し、従って、ポリリジン1個あたりのヘパリンの置換度は490:1であった。ポリエチレン(PE)のチューブを実施例1の記載と同様に調製し、試験して、次の結果が得られた。

	複合体 I	複合体 II
トロンビン補正 (フィブリノーゲン 除去血漿不使用)	0.516±0.021	0.526±0.031
トロンビン残留量 (フィブリノーゲン 除去血漿使用)	0.011±0.001	0.008±0.001

これらの結果はいずれの複合体も満足できる結果を与えることを示している。

実施例3

表面ヘパリン化体外システムの試験

次の成分で構成される体外システムを用いた: 排液(ドレナージ)カテーテル(ポリ塩化ビニル(PVC))動脈カニューレ(PVC+スチール)、チュービングセット(PVC)、ポンプ駆動(エチルブチルアクリレート)、弁(ポリプロピレン(PP)+PE)、酸素供給器(ポリカーボネート+PPの中空繊維)。

それらすべての構成成分を三工程処理により表面ヘパリン化した:

- 1) 過硫酸アンモニウム (1%, 60℃、120分間)
- 2) ポリエチレンジミン (0.3mg/ml、ホウ酸緩衝液、pH 9、室温、15分間)
- 3) 実施例1に従って調製されたヘパリン-ポリリジン複合体を、

特表平6-510783(7)

せた後、それらを塩化ナトリウム溶液で洗浄した。次にそれらチューブをトロンビンの溶液と共にインキュベートし(15U/ml、10分間、室温、回転下)そして塩化ナトリウム溶液で洗浄した。次にそれらチューブの半分をフィブリノーゲン除去した血漿と共に60秒間インキュベートした。表面結合トロンビン活性は、それらチューブをトロンビンの色原性基質と共に60秒間インキュベート後反応をクエン酸添加により止めることにより測定した。得られる吸光度を405nmで測定した。次の値が得られた。

	ヘパリン A との複合体	ヘパリン B(脱炭酸 化合物)との複合体
トロンビン補正 (フィブリノーゲン 除去血漿不使用)	0.629±0.050	0.611±0.156
トロンビン残留量 (フィブリノーゲン 除去血漿使用)	0.003±0.001	0.006±0.001

この結果は、いずれの調製物もトロンビンの補正および阻害に關し完全に満足できる効果を与えることを示している。

実施例2

各種置換度を有する複合体および表面結合生物学的活性試験複合体Iと称される複合体を実施例1の記載と同様にして調製した。ポリリジン1個あたりのヘパリンの最終置換度は240:1であった。

次に複合体IIと称される別の複合体を調製した。この場合の出発材料は、SPDP添加の前にポリリジン溶液中のpHを8に調整することにより調製された、より高いSPDP置換度のポリリジンであった。その置換度は1ポリリジン分子あたり633 SPDP基と測定された。

0.5M NaCl含有クエン酸緩衝液、pH 3.8中、30mg/mlまで希釈し、そして室温で120分間処理した。前記構成成分を最後に、ホウ酸緩衝液、pH 9および水で2×15分間洗浄した。乾燥後、エチレンオキサイドによる滅菌を行った。

この体外システムを右心房と大動脈の間の部分バイパスに対し抗凝固療法を受けていない豚豚に挿入した。この体外システムは、24時間にわたり連続的に約3 l/分をポンプ送達したが凝固による凝血の問題は全くなかった。凝固時間は常に一定値であったが、このことは血液経路へのヘパリン遊離はなかったことを示している。

これらの結果は、体外サポート適用の完全システムをヘパリン複合体で表面ヘパリン化することにより、エチレンオキサイドで滅菌できる、安定で十分機能するヘパリン表面を得ることができることを実証している。

実施例4

溶液中の各種ヘパリン-複合体の生物学的活性の試験

様々な置換度を有するヘパリン-ポリリジン複合体を実施例1および2に従って調製した。複合体の生物学的活性を、抗トロンビン含有緩衝液中または血漿中における第1a因子およびトロンビン阻害能について測定した。得られた結果を既知の比生物学的活性(180 I.U./mg)を有する既知量のヘパリンを添加することにより得られる対応標準グラフと比較した。次の結果が得られた。

特表平6-510783(8)

生物学的活性 I.U./mgヘパリン

接合体	ヘパリン/ ポリリジン	Xa/AT	Xa/血漿	Tr./AT	Tr./血漿
I	235	116	95	48	45
II	480	81	29	10	20
III	550	10	43	18	25

それらの結果は、記載のプロセスが高い生物学的活性および低い生物学的活性を有する接合体の調製に用いることができることを示している。

実施例5

様々なポリリジンのサイズの効果

それぞれ13,000、64,000、98,000、249,000および464,000の分子量を有する異なる5パッチのポリリジンを実施例1に従ってSPDPで反応性して、次の置換度（ポリリジン1分子あたりSPDP-基数）が得られた：

試料	分子量	置換度
I	13,000	6
II	64,000	31
III	64,000	45
IV	98,000	35
V	249,000	87
VI	464,000	158

第一級アミンのための相対的目標度で7,000の値を有するヘパリンを実施例1に従って、遊離チオール基を導入するためにSPDPで反応性して、0.2~0.3の置換度を得た。それぞれの接合体は実施例1に従って調製した。分離は、Sephacryl® S-300またはSephacryl® S-

M NaClで溶出した。空腔成分を集め、そしてSPDPの存在について分析した。SPDPの含量は、キトサン1分子あたり約40 SPDP基に相当する0.972μmole/μlと測定された。

遊離チオール基を有するヘパリンを実施例1に従って調製した。得られたヘパリン溶液に次に塩化ナトリウムを3.5Mの最終濃度となるように添加した。次にそのヘパリン溶液を最初に調製したキトサン-SPDP溶液に優しく攪拌しながら添加し、そして反応を室温で一晩進行させた。分光光度法測定は反応が100%まで進行したことを示していた。その溶液をSephacryl® S-300(Pharmacia LKB Biotechnology AB社、スウェーデン)で分離し、そして空腔成分を集めた。Pebax® (Atochem社(フランス)のポリエーテルブロックアミド)のチューブを実施例1によるトロンビン試験のために調製した。次の結果が得られた：

トロンビン補正 (フィブリノーゲン 除去血漿不使用)	トロンビン残留量 (フィブリノーゲン 除去血漿使用)
0.491±0.016	0.002

これらの結果は、キトサン-ヘパリン接合体を用いて調製された表面が完全に満足できる効果を与えることを実証している。

実施例7

ポリアリルアミンとの接合体の調製

10mgのポリアリルアミン塩酸塩 (Aldrich社、分子量約50,000)を1.5mlのホウ酸緩衝液、pH9に溶解し、それに1.0μlのSPDP (10mg/μl MeOH)を攪拌しながら添加し、そして30分間反応させた。その溶液をPD-10カラムにかけ、それを0.9%NaClで溶出した。空腔成分を集め、そして分析したところポリアリルアミン1分子あたり約192

400(Pharmacia LKB Biotechnology AB社、スウェーデン)を分離媒体とするカラムで行った。接合体Iは遊離ヘパリンから分離し得なかった。他の接合体については、満足できる分離が得られ、また得られた接合体は、実施例1に従ってチューブを表面-ヘパリン化するために用いることができる。(実施例1に従った)トロンビンの補正および阻害に関する試験は次の結果を与えた：

接合体	トロンビン補正 (フィブリノーゲン 除去血漿不使用)	トロンビン残留量 (フィブリノーゲン 除去血漿使用)
I	--	--
II	0.012±0.006	0
III	0.086±0.047	0
IV	0.494±0.009	0.003
V	0.532±0.043	0.005
VI	0.490±0.004	0.004

これらの結果は、接合体II~VIが本発明に従ってヘパリン活性を有する表面の調製に使用できることを示している。しかしながら接合体IV~VIが最良の結果を与えた。

実施例6

キトサンを担体物質とする接合体の調製

キトサン (Seacure 110 L、粘度<20cP、分子量約120,000、Proton Biopolymer A/S社、ドラメン(Drammen)、ノルウェー)を、1%酢酸含有水に10mg/mlとなるよう溶解した。1.5μlの溶液に1.0μlのSPDP (10mg/μl MeOH)を50℃で攪拌しながら添加し、そして反応を1時間進行させた。試料をPD-10カラム (Pharmacia LKB Biotechnology AB社、スウェーデン)にかけ、そして1%酢酸含有0.5

SPDP基に相当する8.46μmole/mlのSPDPを含有していることが示された。この生成物を以下において接合体Iの調製に用いた。

別の10mgのポリアリルアミン塩酸塩をホウ酸緩衝液ではなくて水に溶解し、前記と同様にしてSPDP置換した。その場合、空腔成分は、ポリアリルアミン1分子あたり3.2 SPDP基に相当する1.58μmole SPDP/mlを含有していた。次いで、この生成物を以下の接合体IIの調製に用いた。

もう一つの調製例では、pHを3.5に調節した7μlの水に溶解した2μmoleのポリアリルアミンを1610 μmoleのシアノボロトリドの存在下に861 μmoleのホルムアルデヒドと反応させることにより部分的にメチル化してあるポリアリルアミン塩酸塩が用いられた。一夜反応させた後、酸性ポリアリルアミンをSephadex® G-25 (Pharmacia LKB Biotechnology AB社、スウェーデン)で精製した。10mgの反応性ポリアリルアミン塩酸塩をホウ酸緩衝液、pH8に溶解し、そして前述と同様にSPDPで置換した。その場合、空腔成分はポリアリルアミン1分子あたり約50 SPDP基に相当する1.5μmole/mlを含有した。次にこの生成物を以下の接合体IIIの調製に用いた。

遊離チオール基を有するヘパリンを実施例1に従って調製後、得られたヘパリン-SHをそれぞれのポリアリルアミン-SPDP生成物とSH-およびSPDP-基に関し等モル関係で混合した。1時間反応後、塩含量を3Mまで高め、そして反応を室温で一晩進行させた。反応収率は三つのすべての反応について95%を超えていた。接合体IおよびIIのそれぞれの反応溶液を10M水酸化ナトリウムでpH10に調節し、次いで100μlの無水酢酸を厳しく攪拌しながら添加して遊離アミノ基をアセチル化した。得られたヘパリン接合体、接合

特表平6-510783(9)

体I、接合体IIおよび接合体IIIをそれぞれSephacryl® S-400カラム (Pharmacia LKB Biotechnology AB社、スウェーデン) で精製したところ、接合体は空隙兩分中に得られた。

得られた三種類のヘパリン接合体を用いて、実施例1によるトロンビンの補正および阻害について試験したところ、すべての選択肢が完全に満足できる効果を示した。

	トロンビン補正 (フィブリノーゲン 除去血液不使用)	トロンビン阻害量 (フィブリノーゲン 除去血液使用)
接合体I	0.437±0.008	0.007±0.002
接合体II	0.445±0.020	0.063±0.001
接合体III	0.501±0.032	0.005±0.002

これらの結果は、三種類の接合体のすべてが完全に満足できる効果を与えることを実証している。

実施例8

様々なアミノ官能基質表面を有する表面の調製

ポリエチレンチューブを次のようにしてヘパリン化した(付された印A、B、CおよびDはそれぞれチューブ表面の別の選択肢としてのアミノ官能基処理を示している)：

1. 過硫酸アンモニウム (1%, 60℃, 60分間)
- 2A. ポリエチレンイミン (0.3mg/ml, ポレートpH9、室温、15分間)
- 2B. ポリアリルアミン (10mg/ml, ポレートpH9、室温、15分間)
- 2C. キトサン (10mg/ml, 1% HAc、室温、15分間)
- 2D. ポリリジン (水中5mg/ml、室温、15分間)
3. 実施例1に従って調製されたヘパリン-ポリリジン接合体(ク

して塩化ナトリウム溶液で十分洗浄した。ここで前記チューブを様々な活性段階の血小板および血液タンパク質より成る血栓性材料で被覆した。実施例1に従って調製されたヘパリン-ポリリジン接合体を塩化ナトリウム溶液中で180mg/mlの最終濃度となるように希釈し、次にその溶液をそれらチューブ内で60分間回転させた。それらチューブを最後に、ホウ酸緩衝液、pH9および水で十分洗浄した。

このようにしてヘパリン化されたチューブを実施例1に従ってトロンビンの補正および阻害について試験したところ、供試チューブは完全に満足できる効果を示した。

実施例11

ウレアーゼとの組合せ調製

ポリリジン (10mg、分子量464,000) を1.5mlの水に溶解し、それに1.0mlのSPDP (10mg/ml NaOH) を添加しながら添加し、次に反応を30分間進行させた。その試料をPD-10カラムにかけ、そして0.9% NaClで洗出した。空隙兩分を集め、そして分析したところSPDP含量が1.052mmole/mlであることが示された。

ウレアーゼ(U-1500、タチナタマノ由來、Sigma社、米国) をリン酸緩衝液、pH7.5に10mg/mlとなるように溶解し、そして0.22μmフィルターを通して濾過した。遊離SH基含量は0.161mmole/mlと測定された。

3M NaClに溶解したポリリジン-SPDPをウレアーゼと、利用可能なSPDP基の約10%がウレアーゼのSH基とのジスルフィド交換を受け得るように混合した。343nmにおける分光光度法測定によりこれが生じたことが確認された。次に実施例1に従って遊離SH基

エン酸緩衝液中50mg/ml、0.5M NaCl、pH3.8、室温、120分間)

このようにして調製された表面をホウ酸緩衝液、pH9および水で十分洗浄した。

前述の四つの選択肢に従ってヘパリン化されたポリエチレンチューブを実施例1に記載された如く、トロンビンの補正および阻害について試験したところ、すべての選択肢が完全に満足できる効果を示した。

実施例9

レンズ(PHMA)の表面-ヘパリン化および血小板付着試験

ポリメチルメタクリレート(PHMA)の凹面レンズを実施例1に従ってヘパリン化した後、血小板付着について試験した。

無活性レンズおよび表面-ヘパリン化レンズをそれぞれ、新鮮ヒトクエン酸加全血中で一定の動きを与えながら60分間インキュベートした。それらレンズを次に塩化ナトリウム溶液中でくり返し洗浄してすべての付着血液を除去した。最後にアデノシン三リン酸(ATP)をレンズ表面に付着したすべての血小板から抽出し、そして得られたATPの含量をバイオルミセセンスにより測定した。ヘパリン化レンズへの血小板付着は未処理対照レンズに比べ98%低下した。

実施例10

“生物学的表面”へのヘパリン接合体の吸着

本発明により調製されたヘパリン接合体が血栓性生化学的材料で被覆された表面に不可逆的に吸着され得るかどうかを調べるために次の実験を行った：

ポリエチレンの非表面活性チューブをクエン酸加全血で半分満たしそして60分間回転させた。次にそれらチューブから血液を析しそ

で活性されたヘパリンを添加した(ヘパリン-SH添加量は利用可能なSPDP基の残る90%に相当するものとした)。反応は完了するまで進行した。得られた接合体を最後にSephacryl® S-400カラム (Pharmacia LKB Biotechnology AB社、スウェーデン) で精製したところ、接合体は空隙兩分中に得られた。得られた接合体を試験したところヘパリン活性およびウレアーゼ活性が検出されることが示された。

補正書の翻訳文提出
(特許法第184条の8)

平成 6 年 3 月 25 日

特許庁長官 殿

1. 国際出願の表示

PCT/SE 92/00672

2. 発明の名称

新規複合体、その調製および使用ならびにその複合体を用いて調製された基体

3. 特許出願人

住所 スウェーデン国エーヌー750 08 ウプサラ、ボックス8037
名称 コルリーネ・システムズ・アクチエボラーグ

4. 代理人

住所 東京都千代田区麹町3丁目2番地(相互第一ビル)
電話 (3261) 2022

氏名 (9173) 高 木 千 高 (外2名)

5. 補正書の提出年月日 1993年11月25日

6. 添付書類の目録

補正書の翻訳文(請求の範囲)

1 通

7. 備考

請求項1および4が補正された。

8. 少なくとも100グリコサミノグリカン残基を有する請求項7記載の複合体。
9. 前記グリコサミノグリカンがヘパリンまたはその断片または誘導体である請求項1〜8のいずれか1項記載の複合体。
10. グリコサミノグリカン残基が結合配列を介してポリマー主鎖に結合される請求項1〜9のいずれか1項記載の複合体。
11. 前記結合配列がヘテロ-二官能性結合試薬に由来する請求項10記載の複合体。
12. ポリマー主鎖がグリコサミノグリカン類のほか少なくとも一つの付加的な生物学的に活性な物質の残基を担持する請求項1〜11のいずれかに記載の複合体。
13. 複合体が多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた實質的に鎖状の有機ポリマーであって、それら官能基を介して硫酸化グリコサミノグリカン類からの多数の分子が共有結合を通して結合されているものより成り、該複合体は好ましくは該複合体と基体表面との間の静電的相互作用により表面に結合されていることを特徴とする、表面にアフィニティー結合された生物学的に活性な複合体より成る調製された基体表面。
14. 生物学的に活性な複合体が請求項1〜11のいずれかに記載の複合体である請求項13記載の調製された基体表面。
15. 多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた實質的に鎖状の有機ポリマーを準備し、そしてこれら官能基に、所望により結合剤を介して、その非活性部分の硫酸化グリコサミノグリカン類からの多数の分子を共有結合的に結合させることより成ることを特徴とする、硫酸化グリコサミノグリカン類からの多数の分子

特表平6-510783(10)

請求の範囲

1. 多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた實質的に鎖状の有機ポリマーであって、それら官能基を介して硫酸化グリコサミノグリカン類からの少なくとも約20分子が共有結合を通して結合されそして各グリコサミノグリカンが該グリコサミノグリカンの非活性部分において實質的に単結合を介してポリマー主鎖に結合されているものより成る實質的に水溶性の生物学的に活性な複合体。
2. 前記ポリマーが天然または合成のポリペプチド、多糖体または脂肪族ポリマーに由来する請求項1記載の複合体。
3. 前記ポリマー鎖がポリリジン、ポリオルニチン、キトサン、ポリイミンまたはポリアルルアミンに由来する請求項2記載の複合体。
4. グリコサミノグリカン類が末端でポリマー主鎖に結合されている請求項1、2または3のいずれか1項記載の複合体。
5. グリコサミノグリカン類が該グリコサミノグリカン類に結合したアミノ基を介したポリマー主鎖に結合されている請求項1〜4のいずれかに記載の複合体。
6. 複合体がそのグリコサミノグリカン類の故に、水に溶解された場合に實質的にその全長に沿って正荷電基体表面に静電的相互作用により實質的に不可逆的に結合され得るのに十分なポリ陰イオン特性を有することを特徴とする請求項1〜5のいずれか1項記載の複合体。
7. 少なくとも30グリコサミノグリカン残基を有する請求項1〜6のいずれか1項記載の複合体。

子を担持する實質的に鎖状の有機ポリマーより成る生物学的に活性な複合体の調製方法。

16. 多数の官能基をポリマー主鎖に沿って分布させた實質的に鎖状の有機ポリマーであって、それら官能基を介して硫酸化グリコサミノグリカン類からの多数の分子が共有結合を通して結合されているものより成る複合体を該複合体に対するアフィニティーを有する基体表面と、複合体がそこに實質的に不可逆的に結合されるように接触させることを特徴とする、硫酸化グリコサミノグリカン類による表面の調製方法。
17. 複合体がポリ陰イオン特性を有し、基体表面が陽イオン性である請求項16記載の方法。
18. 治療剤として用いるための請求項1〜12のいずれか1項記載の生物学的に活性な複合体。

[illegible]

07/12/82

This agency does not release security information according to the national declassification schedule unless the information is determined to be of exceptional significance. This information is an exception to the declassification schedule. Unless otherwise noted, this information is exempt from release under E.O. 13526, which is hereby granted for the purpose of declassification.

Person identified other than subject report	Declassification date	Person identity (last name)	Declassification date
EP-A1- 0294905	88-12-14	JP-A- ML-A- US-A-	2131769 8701337 5061750 90-05-21 89-01-02 91-10-29
US-A- 4415490	83-11-15	US-A-	4329383 82-05-11
WD-A1- 8700460	87-01-15	CA-A- CH-A-G- EP-A-G- JP-T- US-A-	1892687 665964 8228387 63500079 4387181 91-12-03 88-06-30 87-07-15 88-01-14 91-01-22
EP-A1- 0212933	87-03-04	JP-A- US-A-	62038172 4806595 87-02-19 89-02-21

(51) Int. Cl. ⁵
A 6 1 K 37/02

識別記号 庁内整理番号
8314-4C

FI

(72)発明者 フォルムグレン、ビルギッタ
スウェーデン国エス-754 37 ウブサラ、
ミュラーガタン 30ペー

(72) 発明者 ウーリン, アーデルス
スウエーデン国エス-753 50 ウプサラ,
グローバルス ヴエイエン18